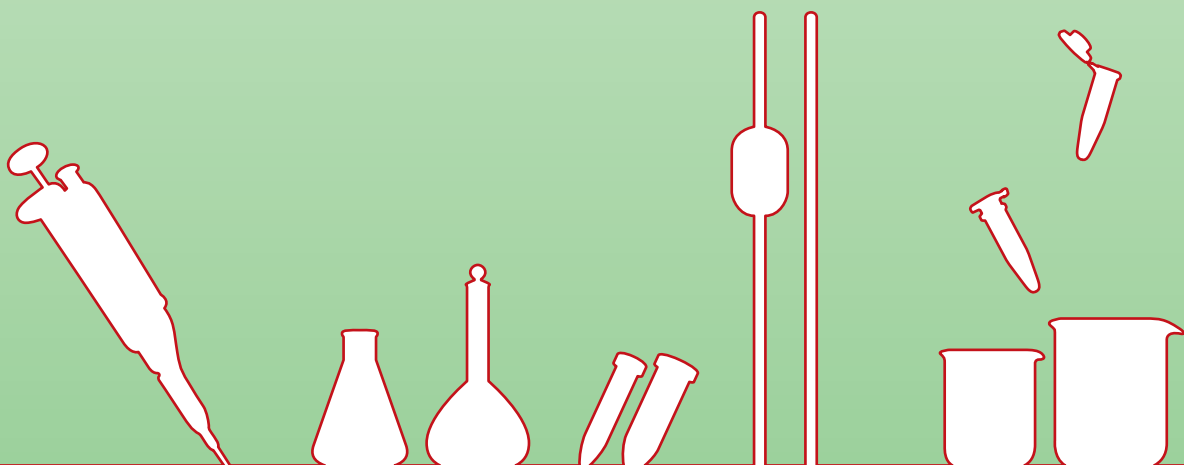
クローニング実験ハンドブック

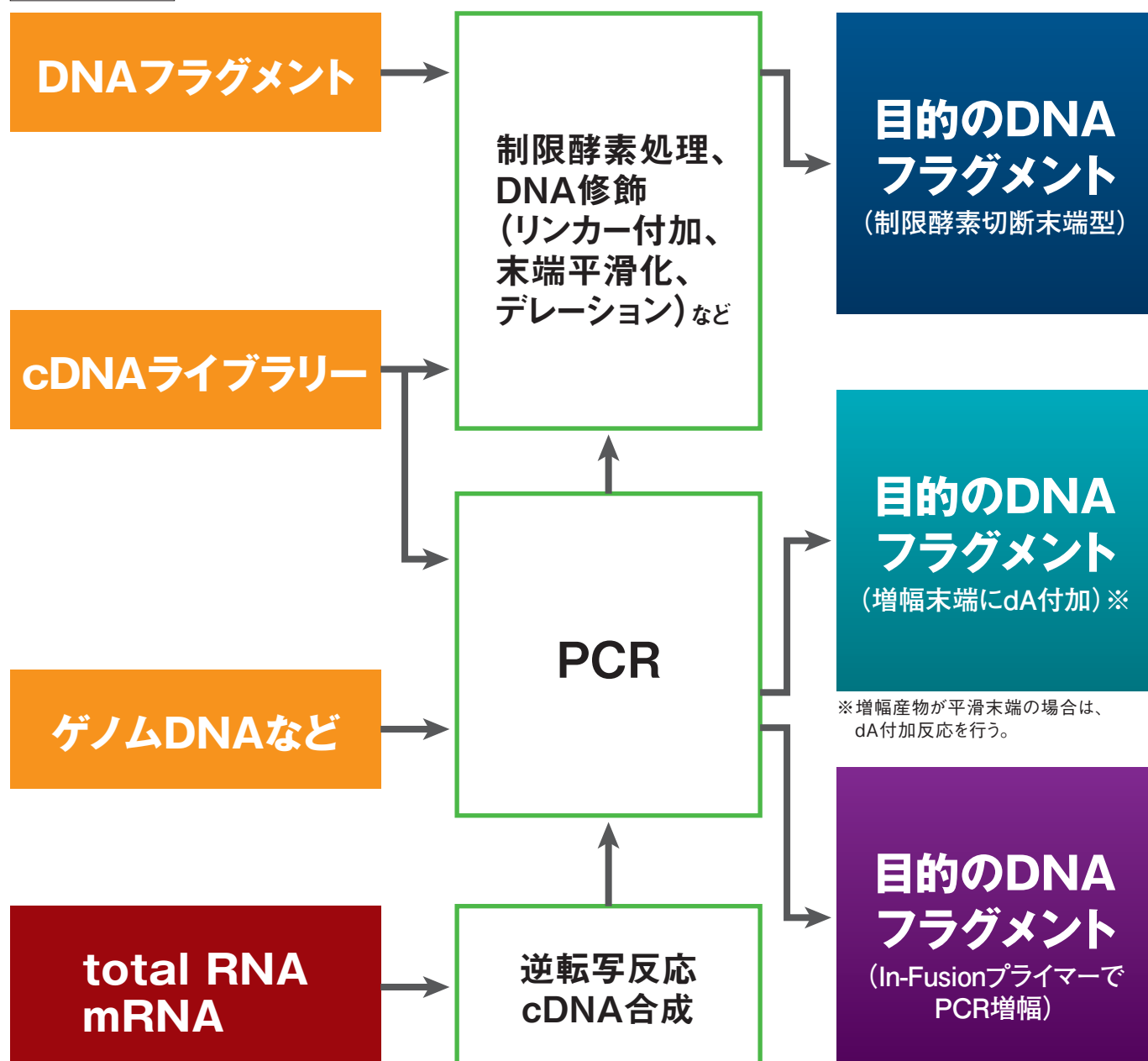
★ライゲーションの基本から
ディレクショナルクローニングまで★

TaKaRa

クローニング実験の手引き

目的のDNA（ターゲット配列）を任意のベクターに載せるクローニング操作は、遺伝子工学実験の基礎技術の一つであり、現在も様々な研究場面で利用されています。
制限酵素の発見とその応用により、クローニングは汎用性の高い手法として浸透しましたが、近年では制限酵素処理をベースとしないクローニング方法（TA cloning法やIn-Fusion法）の開発により、さらに自由度の高いクローニングが可能になっています。
また、クローニングを行うには、目的サンプルからのゲノムDNAやRNAの抽出・精製、mRNAからの逆転写反応によるcDNA合成、PCRによるDNA断片の増幅などを組み合わせて、目的DNA断片を取得することも重要なステップです。

本ハンドブックでは、制限酵素を用いたオーソドックスなクローニング法や汎用的なTAクローニング法、最新のクローニング法であるIn-Fusionクローニング法に加え、クローニングの前後に必要な実験操作（DNA精製、cDNA合成、PCR、コロニーPCRなど）も併せて紹介しています。

クローニングを初めて行う方からある程度経験されている方まで、多くの研究者の皆様に役立つ内容を載せた『クローニング実験ハンドブック』を、お手元に置いてどうぞご活用ください。

クローニング操作の基本的な流れ

各クローニング方法の特徴

クローニング方法	インサートDNA断片の末端構造	ベクター調製
制限酵素／ライゲーション	DNA断片の両端に制限酵素部位を形成させる必要がある。異なる制限酵素部位を利用すれば方向を決めた挿入ができる。	DNA断片の両端に対応する制限酵素で処理。切断後、精製や脱リン酸化が必要な場合がある。
TAクローニング	3'末端にdAを付加するPCR酵素で反応を行う、あるいは平滑末端の増幅産物にdAを付加する反応が必要。 挿入の方向は決められない。	3'末端にdTを付加した市販ベクターを利用
In-Fusionクローニング	ベクターの末端15塩基と相補的な配列を付加したPCRプライマーで、目的遺伝子を増幅する。任意のベクターで方向を決めた挿入が可能。	任意のベクターで使用可能。制限酵素処理、またはPCR増幅により線状化するだけ。

制限酵素／ライゲーション

線状化ベクター*

BamH I
5' GATC
TCGA 5'
Hind III
CTAG
AGCT

*環状ベクターを制限酵素で切断後、ゲル切り出し、または（および）脱リン酸化が必要

TAクローニング

Tベクター

3' A
A 3'
T
T

In-Fusionクローニング

5 × In-Fusion® HD Enzyme Premix

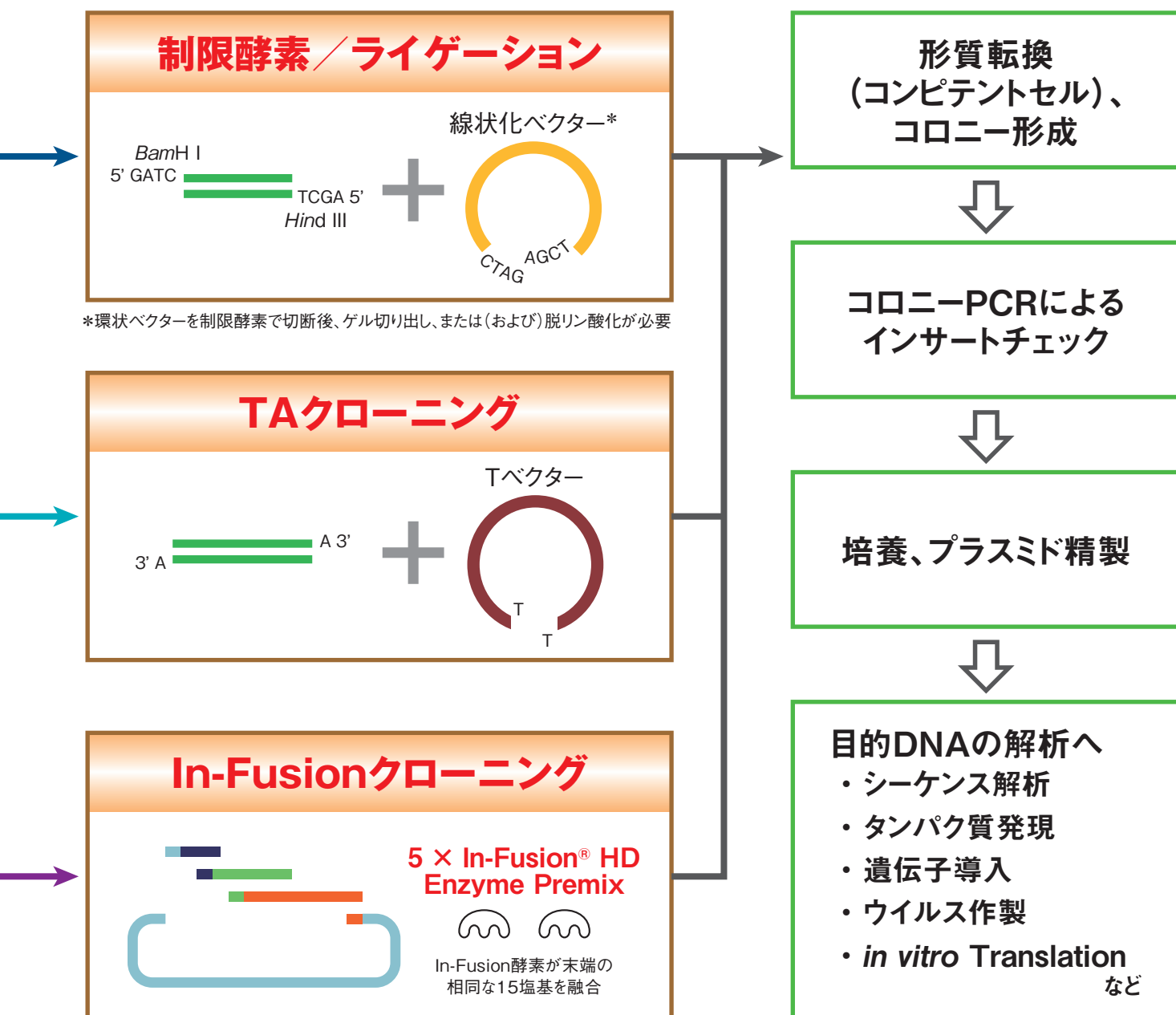
In-Fusion酵素が末端の相同な15塩基を融合

形質転換（コンピテントセル）、コロニー形成

コロニーPCRによるインサートチェック

培養、プラスミド精製

目的DNAの解析へ
- シーケンス解析
- タンパク質発現
- 遺伝子導入
- ウイルス作製
- *in vitro* Translation

など

制限酵素／ライゲーションによるクローニング

目的のDNA断片を目的のベクタープラスミドに載せるクローニング操作は遺伝子工学実験の基本です。
ここでは制限酵素とT4 DNAリガーゼ（DNA Ligation Kit）を用いたクローニング操作を解説します。

操作方法の概要

1.インサートDNAの準備（目的のDNA断片の調製）

(a) 制限酵素での切り出し

あらかじめ目的DNA断片の制限酵素切断箇所を確認し、次に使用するベクタープラスミドのクローニングサイトに合わせて、切り出しに使用する制限酵素を選定する。

制限酵素*Hind* IIIと*Bam*H Iでのdouble digestionの例

①反応液を調製する。

基質DNA	（≦ 1 μg）	
Hind III	1 μl	
*Bam*H I	1 μl	
10 × K Buffer	2 μl	
滅菌蒸留水	up to 20 μl	（軽くタッピングして混合）

↓

②37℃で1時間 反応

↓

③アガロースゲル電気泳動により切断を確認
※反応液の半分（10 μl程度）にLoading Bufferを加えて泳動

↓

④目的DNA断片のバンドを含むゲルを切り出す。
※DNAの損傷を抑えるため、UV照射は短時間で行う。

↓

⑤NucleoSpin® Extract II 等を用いて、ゲルからDNAを精製
（ゲル抽出操作手順は10ページを参照）

↓

⑥ インサートDNA溶液[A]とする。

(b) PCRによる増幅

ベクターとの連結に使用する制限酵素切断部位を5'側に付加★したプライマーを用いて、インサートDNAのPCR増幅を行う。
★制限酵素切断部位＋さらに5'側に3塩基以上を付加

***TaKaRa Ex Taq*® Hot Start Versionを使用した例**

①PCR

10 × *Ex Taq* Buffer（Mg^{2+} plus）	5 μl	
dNTP Mixture（各2.5 mM）	4 μl	（各200 μM）
primer 1	0.2～1.0 μM	（final conc.）
primer 2	0.2～1.0 μM	（final conc.）
鋳型DNA	＜ 500 ng	
TaKaRa Ex Taq® HS	1.25 U	
滅菌蒸留水	up to 50 μl	
	（軽くタッピングして混合）	

98℃ 10 sec.	30 cycles
55℃ 30 sec.	
72℃ 1 min./kb	

↓

②制限酵素反応により両端を切断（必要に応じてスケールアップ）

上記反応液	≦ 2 μl	
Hind III	1 μl	
*Bam*H I	1 μl	
10 × K Buffer	2 μl	
滅菌蒸留水	up to 20 μl	（軽くタッピングして混合）

↓

③37℃で1時間 反応

↓

④NucleoSpin® Extract II 等を用いて、ゲルからDNAを精製
（10ページを参照）

↓

⑤回収した溶液をインサートDNA溶液[A]とする。

2.ベクタープラスミドの準備

①目的のベクタープラスミド（環状）のクローニングサイトを制限酵素で切断
【ベクターの線状化】

ベクタープラスミドDNA	（≦ 1 μg）	
Hind III	1 μl	
*Bam*H I	1 μl	
10 × K Buffer	2 μl	
滅菌蒸留水	up to 20 μl	（軽くタッピングして混合）

↓

②37℃、1時間 反応

↓

③NucleiSpin® Extract II等を用いて、反応液からDNAを精製
（10ページを参照）

↓

④TE Buffer（20 μl 以下）に溶解し、プラスミドDNA溶液[B]とする。

！ 1種類の制限酵素でインサートDNAの調製、ベクタープラスミドの線状化を行う場合は、線状化したベクターのセルフライゲーションを防止するため、下記の脱リン酸化処理を行う。

脱リン酸化処理（セルフライゲーションの防止）

制限酵素処理済みベクタープラスミド	1～20 pmol
Alkaline Phosphatase（BAP）	0.3～0.6 U
10 × BAP Buffer	5 μl
滅菌蒸留水	up to 50 μl
	（軽くタッピングして混合）

↓

37～65℃で30分間反応

↓

フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25:24:1）抽出（2回）

↓

クロロホルム／イソアミルアルコール（24:1）抽出（1回）

↓

エタノール沈殿

↓

TE Buffer（20 μl 以下）に溶解し、プラスミドDNA溶液[B]とする。

※5'-突出末端の脱リン酸化はCIAP（Calf Intestinal Alkaline Phosphatase）による処理でも十分ですが、平滑末端や3'-突出末端の脱リン酸化にはBAP（Bacterial Alkaline Phosphatase）の使用を推奨します。

3. インサートDNAと線状化プラスミドのライゲーション

DNA Ligation Kit〈Mighty Mix〉使用の場合

インサートDNA溶液［A］	25～250 fmol
プラスミドDNA溶液［B］	50 ng（25 fmol）
Ligation Mix	7.5 μl
滅菌蒸留水	up to 15 μl

↓

16℃、30分反応（または25℃、5分反応）

4.形質転換

E. coli HST08 Premium Competent Cells使用の場合

①HST08コンピテントセル100 μlを使用直前に氷上で融解して穏やかに混和後、14 ml丸底チューブに移す（ボルテックス不可）。

↓

②ライゲーション反応後の溶液10 μlを加え、氷中30分間放置

↓

③42℃で 45秒間インキュベート後、氷中1～2分間放置

↓

④あらかじめ37℃に保温したSOC培地を最終1 mlになるように加える。

↓

⑤37℃で1時間振とう（160～225 rpm）

↓

⑥LB選択プレートに適当量まき、37℃で一晩静置

5.インサートチェックPCR
6.培養、プラスミド精製

インサートチェックPCRは5ページを、プラスミド精製は10ページを参照

! よくある質問

【Q1】ライゲーションが起こりにくく、形質転換効率が悪いときに注意する点は?

【A1】

・ライゲーション反応時間を延長してください。

・DNA溶液の塩濃度が高いとライゲーション効率が低下します。特にエタノール沈澱時の酢酸アンモニウム塩は阻害作用を示しますので、エタノール沈澱の際には塩が残らないよう、丁寧に洗浄操作を行ってください。

・DNA抽出キットを使用した場合、抽出液のエタノール沈澱を行いバッファー交換することで、ライゲーション効率が改善することがあります。

・突出末端のライゲーションの場合、DNA溶液（ベクター+インサートDNA）を60～65℃で2～3分加温後、急冷してからLigation Kitの各試薬を加え反応を行って下さい。ライゲーションに有効な突出末端が確保され、形質転換効率が改善されることがあります。

以上の操作で改善されない場合はDNAの再精製を推奨します。

【Q2】長鎖のクローニングで気をつける点は?

【A2】長鎖になるほどライゲーション効率が低下する傾向があります。TaKaRa DNA Ligation Kit LONG（製品コード 6024）は長鎖DNAのライゲーションに最適化してあり、10 kb以上のライゲーションを行う場合に威力を発揮します。

また、インサートDNAを含めたプラスミドの全サイズが大きい場合（特に10 kbを超える場合）は大腸菌への導入効率が低くなり、大腸菌内でのプラスミドの安定性も低下することがあるため、欠失したクローンになる確率が高くなります。大きなサイズのDNAを効率よく形質転換できる*E. coli* HST08 Premium Competent Cells（製品コード 9128）の使用をお勧めします。

【関連製品リスト】

	製品名	容量	製品コード	価格(税別)
制限酵素、脱リン酸化	*Hind* III	10,000 U	1060A	¥6,500
	*Bam*H I	10,000 U	1010A	¥6,500
	Alkaline Phosphatase（*E. coli* C75）	50 U	2120A	¥10,500
	Alkaline Phosphatase（Calf intestine）	1,000 U	2250A	¥10,500
PCR	*TaKaRa Ex Taq*® Hot Start Version	250 U	RR006A	¥30,000
ライゲーション、形質転換	DNA Ligation Kit〈Mighty Mix〉	1 Kit	6023	¥26,000
	TaKaRa DNA Ligation Kit LONG	1 Kit	6024	¥26,000
	E. coli HST08 Premium Competent Cells	1 Set（100 μl × 10）	9128	¥21,000
	E. coli JM109 Competent Cells	1 Set（100 μl × 10）	9052	¥19,000
DNAクリーンアップ	NucleoSpin® Extract II	10回	740609.10	¥5,300
プラスミド精製	NucleoSpin® Plasmid QuickPure	10回	740615.10	¥4,200
電気泳動	Agarose L03「TAKARA」	100 g	5003	¥17,000
	100 bp DNA Ladder	500 μl（100回）	3407A	¥19,000
	λ-*Hind* III digest	100 μg	3403	¥8,500

TAクローニング

Taq DNA PolymeraseなどのPCR酵素による増幅産物は、その3'末端にデオキシアデノシン(dA)が一塩基付加されています。TAクローニングでは、3'末端にデオキシチミジン(dT)を一塩基付加したTベクターを使用し、PCR増幅産物のdA一塩基突出部分と相補的となることを利用して簡便にクローニングを行います。(インサートDNAの5' 末端のリン酸化は不要です。)

操作方法の概要

1.インサートDNAの準備(目的DNA断片の調製)

①PCRによる増幅(*TaKaRa Ex Taq*®使用の場合)

10 × *Ex Taq* Buffer(Mg^{2+} plus)	5 μl	
dNTP Mixture(各2.5 mM)	4 μl	(各 200 μM)
primer 1	0.2〜1 μM	(final conc.)
primer 2	0.2〜1 μM	(final conc.)
鋳型DNA	< 500 ng	
TaKaRa Ex Taq®	1.25 U	
滅菌蒸留水	up to 50 μl	

(軽くタッピングして混合)

98℃ 10 sec. 55℃ 30 sec. 72℃ 1 min./kb	30 cycles

※PrimeSTAR®などα型のPCR酵素では、3'末端にdAが付加しないので注意が必要(次ページ参照)。

↓

②アガロースゲル電気泳動により増幅産物を確認する。
・増幅産物がシングルバンドの場合は「2.Tベクターとのライゲーション」に進む。
・プライマーダイマーや非特異的な増幅バンドが認められた場合は、電気泳動後アガロースゲルから目的DNA断片のバンドを切り出し、DNAを精製する(③)。

↓

③NucleoSpin® Extract II等を用いてゲルからDNAを精製
(10ページを参照)

↓

④回収した溶液をインサートDNA溶液とする。

2.Tベクターとのライゲーション

Mighty TA-cloning Kit使用の場合

①新しいチューブに以下を用意する。

滅菌蒸留水	3 μl
pMD20-T Vector	1 μl (50 ng)
PCR産物 (インサートDNA溶液)	1 μl

↓

②Ligation Mighty Mixを5 μl 加え、穏やかに混合

↓

③ 16℃で30分間インキュベートする。

3.形質転換

E. coli HST08 Premium Competent Cells使用の場合

①HST08コンピテントセル100 μlを使用直前に氷上で融解して穏やかに混和後、14 ml 丸底チューブに移す(ボルテックス不可)。

↓

②ライゲーション反応後の溶液10 μlを加え、氷中30分間放置

↓

③42℃で 45秒間インキュベート後、氷中1〜2分間放置

↓

④あらかじめ37℃に保温したSOC培地を最終1 mlになるように加える。

↓

⑤37℃で1時間振とう(160〜225 rpm)

↓

⑥LB選択プレート(LB+Amp+X-Gal)に適当量まき、37℃で一晩静置

↓

⑦青/白判定で白コロニーを候補とする。

※*E. coli* JM109を使用する場合はアンピシリン、X-Gal、IPTGを含むLBプレートに塗布する。37℃で一晩培養し、青/白判定で白コロニーを候補とする。

4.インサートチェックPCR

EmeraldAmp® PCR Master Mix使用の場合

EmeraldAmp® PCR Master Mix(2 × Premix)	25 μl
Forward Primer	0.2 μM (final conc.)
Reverse Primer	0.2 μM (final conc.)
dH_2O(滅菌水)	up to 50 μl

↓

②プレート上のコロニーをチップの先でごく少量掻き取り、上記のPCR反応液に懸濁して増幅する。

98℃ 10 sec. 55℃ 30 sec. 72℃ 1 min./kb	30 cycles

↓

③PCR反応液を一部アガロースゲル電気泳動に供しインサートを確認

5.培養、プラスミド精製

①目的のプラスミドを持つことを確認したコロニーを取り、LB+Amp培地2 mlに加えて一晩振とう培養する。

↓

②NucleoSpin® Plasmid QuickPure等を用いてプラスミドDNAを精製する。
(精製手順は10ページ参照)

PCR酵素の種類と末端形状

PCR用DNAポリメラーゼは大きく2つのタイプに分けられます。*Taq* DNA Polymeraseをはじめとするpol I型(family A)酵素と、*Pfu* DNA Polymeraseに代表されるα型(family B)酵素です。

Pol I型DNAポリメラーゼおよびPol I型をベースとする改良型PCR酵素(*TaKaRa Ex Taq*®など)の増幅産物のほとんどは、その3'末端にデオキシアデノシン(dA)が一塩基付加されています。これを利用してPCR産物をそのままTAクローニングに使用可能です。

一方、α型DNAポリメラーゼによる増幅産物のほとんどは、酵素自身がもつ強力な3'→5'exonuclease活性により平滑末端となっており、そのままではTAクローニングに使用できません。平滑末端のPCR産物をTAクローニングに用いる場合には、3'末端にdAを付加する必要があります。

タカラバイオでは、通常のTAクローニング用試薬「Mighty TA Cloning Kit」に加え、α型DNAポリメラーゼによる増幅産物専用のTAクローニング用試薬「Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR®」をご用意しています。本キットには平滑末端をもつPCR増幅産物の3'末端にdAを付加するためのA-overhang mixtureが添付されており、簡便な操作でTAクローニングが可能です。

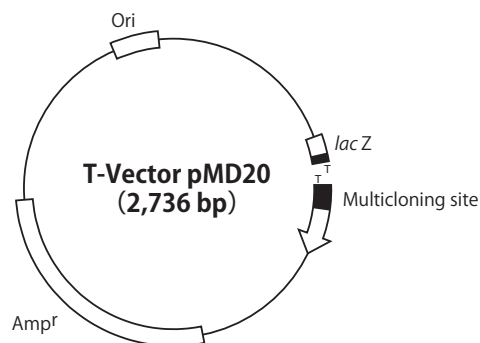
PCR酵素のタイプ	Pol I型(family A)	α型(family B)
増幅産物の3'末端の形状	dAが付加される(TAクローニング可)	平滑末端
酵素名	*TaKaRa Ex Taq*® *TaKaRa LA Taq*® *TaKaRa Taq*™ MigythAmp®シリーズ EmeraldAmp® SapphireAmp® SpeedSTAR®	PrimeSTAR® シリーズ

Tベクターについて

TA Cloning Kitの他に、2種類のTベクター、T-Vector pMD20およびT-Vector pMD19(Simple)を販売しています。いずれも形質転換体の青/白選択が可能です。
T-Vector pMD19(Simple)ではpUC19に由来するマルチクローニングサイト上のすべての制限酵素サイトが除去されているため、クローニング後インサート部分の制限酵素サイトを利用する場合に便利です。

5 kb以上のPCR産物のクローニング

長鎖のPCR産物(5 kb以上)の場合、TAクローニング効率が低下するため、平滑末端クローニングをお勧めします。末端平滑化およびリン酸化のための簡便な前処理用試薬を含むMighty Cloning Reagent Set (Blunt End)(製品コード 6027)の使用が便利です。

PrimeSTAR®シリーズなどα型ポリメラーゼで増幅した平滑末端のPCR産物をリン酸化して平滑末端クローニングを行う場合にも、Mighty Cloning Reagent Set(Blunt End)をご利用ください。

【関連製品リスト】

	製品名	容量	製品コード	価格(税別)
TAクローニングキットおよびTベクター	Mighty TA-cloning Kit	20回	6028	¥21,000
	Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR®	20回	6019	¥32,000
	T-Vector pMD20	1 μg	3270	¥9,500
	T-Vector pMD19(Simple)	1 μg	3271	¥9,500
形質転換用コンピテントセル	*E. coli* HST08 Premium Competent Cells	1 Set(100 μl × 10)	9128	¥21,000
	E. coli JM109 Competent Cells	1 Set(100 μl × 10)	9052	¥19,000
	E. coli DH5α Competent Cells	1 Set(100 μl × 10)	9057	¥19,000
インサートチェックPCR	EmeraldAmp® PCR Master Mix	160回	RR300A	¥16,000
DNAクリーンアップ	NucleoSpin® Extract II	10回	740609.10	¥5,300
プラスミド精製	NucleoSpin® Plasmid QuickPure	10回	740615.10	¥4,200
電気泳動	Agarose L03「TAKARA」	100 g	5003	¥17,000
	100 bp DNA Ladder(Dye Plus)	500 μl(100回)	3422A	¥19,000
	λ-*Hind* III digest	100 μg	3403	¥8,500

In-Fusion クローニング

ClontechのIn-Fusion酵素を用いてDNA断片同士の末端15塩基の相同配列を融合させることでクローニングを行います。使用する任意のベクターの末端配列を利用してクローニングを行うため、あらゆるベクターが使用でき、余分な配列が一切付加されず、しかも定方向クローニングを行うことができる優れた手法です。

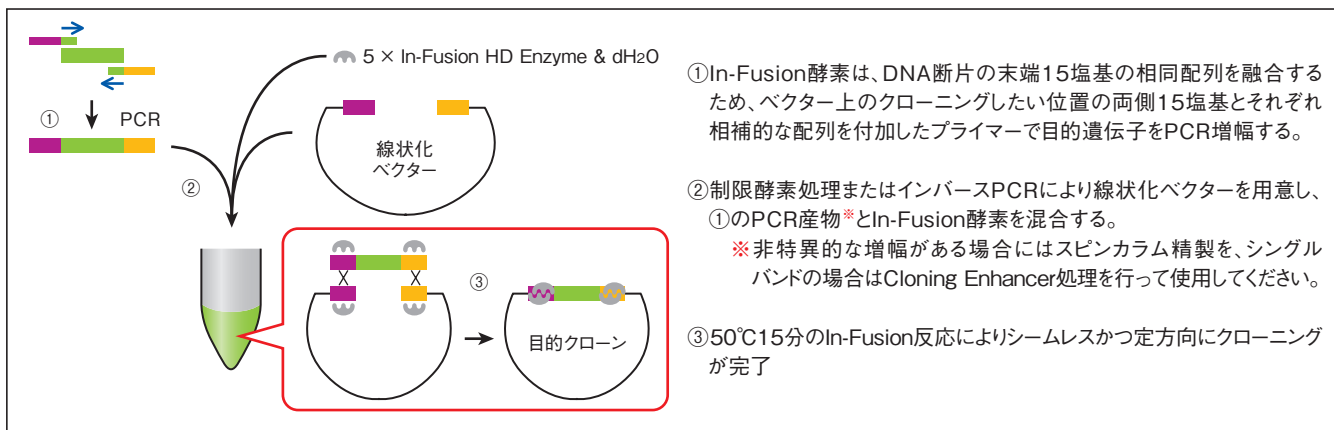
In-Fusionキットはクロンテック社の製品です。

原理と特長

- インサートの種類、クローニング部位、ベクターを選ばずディレクショナルにクローニング
- 短鎖から長鎖（50 bp～15 kb）まで効率よくクローニング可能
- 1回の反応で、複数DNA断片の同時クローニングも可能
- In-Fusion反応はわずか15分で完了

①In-Fusion酵素は、DNA断片の末端15塩基の相同配列を融合するため、ベクター上のクローニングしたい位置の両側15塩基とそれぞれ相補的な配列を付加したプライマーで目的遺伝子をPCR増幅する。

②制限酵素処理またはインバースPCRにより線状化ベクターを用意し、①のPCR産物※とIn-Fusion酵素を混合する。
※非特異的な増幅がある場合にはスピンカラム精製を、シングルバンドの場合はCloning Enhancer処理を行って使用してください。

③50℃15分のIn-Fusion反応によりシームレスかつ定方向にクローニングが完了

操作方法の概要

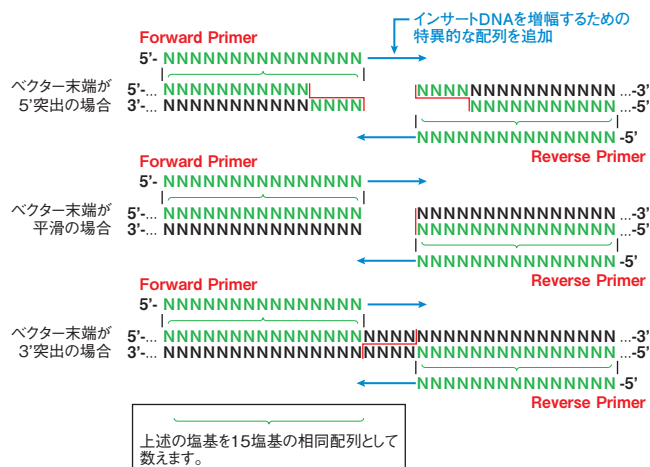
（プロトコールの詳細については必ず取扱説明書を確認してください。）

1.線状化ベクターおよびインサートDNAの調製

①使用するベクターとクローニング部位を決定し、制限酵素処理またはインバースPCRによりベクターを線状化する。

…線状化ベクター溶液［A］

↓

②インサートDNAのPCR増幅のためのIn-Fusion Primerを設計する。

In-Fusion酵素は、各DNA断片の末端15塩基の相同配列を認識してこれを融合させます。このため目的インサートをPCR増幅する場合には、使用する線状化ベクターの末端配列に相同な15塩基を、配列特異的プライマーの5'末端に付加することがポイントです。上図のように線状化ベクターの末端形状に合わせて、In-Fusion Primerを設計してください。なお、In-Fusion Cloning反応は増幅産物のA-overhangの有無による影響を受けないため、PCR増幅産物のA-overhangを考慮する必要はありません。

↓

③インサートDNAをPCR増幅する。
（Advantage® HD Polymerase Mixを用いた場合）

試薬	量
5 × Advantage HD Buffer（Mg^{2+}）	5 μl
dNTP Mixture（2.5 mM each）	2 μl
FW Primer/RV Primer	各0.2～0.3 μM
Advantage® HD Polymerase（2.5 units/μl）	0.25 μl
Template	200 ng
Sterile deionized H_2O	up to 25 μl

98℃ 10 sec.
55℃ 5 sec. または15 sec.　┐ 30 cycles
72℃ 1 min/kb

プライマー設計用ウェブツール

便利なオンラインサポートツール、「In-Fusionプライマー設計サイト（In-Fusion Primer Design Tool）」をご利用ください。
http://bioinfo.clontech.com/infusion/

2.アガロースゲル電気泳動でPCR増幅産物を確認

①電気泳動の結果に応じて、以下のようにインサートDNAを処理する。

- **増幅産物に非特異的な増幅が認められた場合：**
  目的バンドのみを切り出し、NucleoSpin® Extract IIを用いてスピンカラム精製を行う。

- **増幅産物がシングルバンドの場合はCloning Enhancer処理を推奨：**

PCR反応液	5 μl
Cloning Enhancer	2 μl

37℃ 15分→80℃ 15分

↓

②インサートDNA溶液[B]とする。

3. In-Fusion Cloning反応

5 × In-Fusion® HD Enzyme Premix	2 μl
線状化ベクター[A]	x μl
精製済／CE処理済みPCR断片[B]	y μl
dH_2O	up to 10 μl

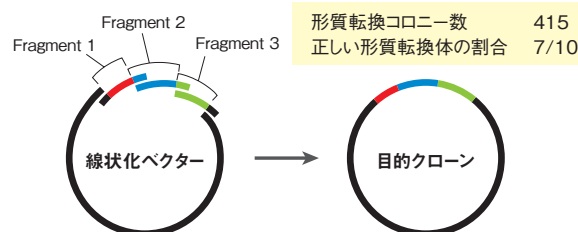
50℃、15分反応→氷上静置

4.大腸菌への形質転換

Stellar™ Competent Cells（製品コード 636763）や*E. coli* HST08 Premium Competent Cells（製品コード 9128）など、形質転換効率が1×10⁸ cfu/μgプラスミドDNA以上のコンピテントセルの使用を推奨します。

5.インサートチェックPCR、培養、プラスミド精製

インサートチェックPCRは5ページを、プラスミド精製は10ページを参照

複数DNA断片のマルチクローニング

In-Fusion Cloningならマルチクローニングも効率よく行うことができます。各1 kbのDNA断片をIn-Fusion® HD Cloning Kitを用いてクローニングし、コロニーPCRによりインサートを確認したところ、10クローン中7クローンで正しい挿入が確認できました。

【関連製品リスト】

製品名	Cloning Enhancer（添付製品）	NucleoSpin® Extract II（添付製品）	Stellar™ Competent Cell（添付製品）	容量	製品コード	価格(税別)
In-Fusion® HD Cloning Kit w/Cloning Enhancer※	✓			10回	639633	¥22,000
In-Fusion® HD Cloning Kit w/NucleoSpin®※		✓		10回	639639	¥24,000
In-Fusion® HD Cloning Kit w/Competent Cells※			✓	10回	639642	¥36,000
In-Fusion® HD Cloning System CE※	✓		✓	10回	639636	¥37,000
In-Fusion® HD Cloning System※		✓	✓	10回	639645	¥39,000
In-Fusion® HD Cloning Kit※				10回	639648	¥21,000
In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit※				8回	639689	¥21,000

※プレミックス済み液体タイプのIn-Fusion HDには、上記のほか、50回包装と100回包装があります。

※In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kitは、凍結乾燥タイプ（室温、デシケーター内保存可能）のIn-Fusion® HDキットです。マイクロチューブに分注済みのため直ちに使用することができます。24回タイプ（8連チューブ×3本）、96回タイプ（96ウェルプレート）もあります。

In-Fusion® HD添付製品

Cloning Enhancer

PCR産物がシングルバンドの場合に増幅産物をそのままIn-Fusion反応に用いるための前処理試薬。この処理により、PCRに使用したプライマーや鋳型プラスミド、dNTPの影響を受けず、In-Fusion酵素が最大のパフォーマンスを示すことができる。

NucleoSpin® Extract II

PCR産物が複数バンドの場合にゲル精製を行うスピンカラム

Stellar™ Competent Cells

高い形質転換能を持つコンピテントセル。長鎖プラスミドDNAの形質転換においても高い効率が得られ、同様の遺伝子型を持つ他のコンピテントセルと比較してコロニー形成速度が速い。pUC系プラスミドでの形質転換の際には、β-ガラクトシダーゼのα-相補性を利用し、X-Gal添加による組換え体の青／白選別を行うことができる。

逆転写酵素＆cDNA合成

単離精製されたRNAから、RT-PCRまたはLibrary作製を行う場合、まず逆転写酵素（Reverse Transcriptate：RTase）でcDNA化する必要があります。ここでは、MMLV由来のRTaseによる1st Strand cDNA合成を行うための一般的なプロトコールを紹介します。

現在、研究用試薬として汎用されている逆転写酵素には、avian myeloblastosis virus（AMV）に由来するものと、moloney murine leukemia virus（M-MLV）に由来するものの2種類がある。従来、mRNA高次構造の存在を回避する手段として熱安定性が高いAMV RTaseが使用されていたが、近年、MMLV由来の改良型酵素（PrimeScript® RTaseなど）の性能が向上したため、こちらが主流になりつつある。なお、逆転写酵素を用いたcDNA合成では、RNA上に反応開始位置となるプライマーをアニールさせるが、このプライマーには使用目的の違いから、以下の3種類がある。

1. オリゴdTプライマー：mRNAのpolyA tailにアニールさせ、3'側から選択的にcDNAを作る。
2. ランダムプライマー（通常、6塩基から9塩基程度）：mRNAのすべての領域からcDNA合成を開始させる。
3. 既知の配列特異的なプライマー：特定のcDNAのみを合成する。

操作方法の概要

1st strand cDNA合成

PrimeScript® RTase使用の場合

①マイクロチューブ内に以下の鋳型RNA/Primer混合液を調製する。

Oligo dT primer	50 pmol
(or Random primer (6mers)	50 pmol)
(or Gene specific primer	2 pmol)
dNTP mixture (10 mM each)	1 μl
total RNA*1	≦ 5 μg
(or mRNA	≦ 1 μg)
RNase free dH_2O	up to 10 μl

↓

②65℃で5分間保温した後、氷上で急冷する。*2

↓

③以下の反応液を加え、全量を20 μlにする。

上記鋳型RNA/Primer Mixture	10 μl
5 × PrimeScript Buffer	4 μl
RNase Inhibitor	20 units
PrimeScript® Reverse Transcriptase	100～200 units
RNase free dH_2O	up to 20 μl

↓

④軽く撹拌する。

↓

⑤以下の条件で反応する。

(30℃	10 min.)*3
42℃（～50℃）*4	30 ～ 60 min.

↓

⑥70℃で15分間保温した後、氷上で冷却する。

↓

こうして得られた1st strand cDNAは、PCRの鋳型として、あるいは2nd strand cDNA合成反応に使用できる。

! チェックポイント

*1 cDNA合成を成功させるためには純度の高いRNAサンプルを得ることが重要。そのためには、細胞内に含まれるRNaseの作用を抑えること、また使用する器具や溶液など外部からのRNaseの混入を避けることが必要になる。RNA調製の際は、実験者の汗や唾液に含まれるRNaseの混入を防ぐため作業中は不必要に話さず、清潔なディスポーザブルグローブの着用を勧める。

*2 熱変性処理により、RNAの高次構造を解消

*3 Random 6 mersを用いた場合に必要

*4 RNAの分解を避けるためには長時間の高温処理を避ける方が望ましい。
近年MMLV由来改良型RTaseの性能が上がり、PrimeScript® RTaseのように、42℃反応でもRNA高次構造による伸長反応阻害を回避できる酵素が販売されている。

【関連製品リスト】

	製品名	容量	製品コード	価格（税別）
最高品質の1st strand cDNAの合成に推奨	PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit	50回	6210A	¥34,000
汎用RT-PCRキット	PrimeScript® RT-PCR Kit	50回	RR014A	¥31,000
	PrimeScript® One Step RT-PCR Kit Ver.2	50回	RR055A	¥42,000
完全長cDNAの取得	SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit	10回	634925	¥174,000
卓越した伸長能をもつ逆転写酵素	PrimeScript® Reverse Transcriptase	10,000 U	2680A	¥29,000

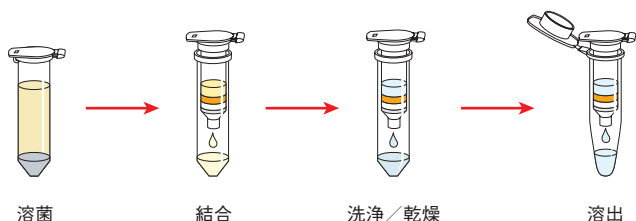
核酸の精製

PCR反応後のプライマー除去、アガロースゲルからのDNA回収、プラスミドDNA精製など、クローニングの様々な場面で迅速・簡便かつ高純度に核酸精製を行うためにスピンカラムタイプの核酸精製キットを使用します。
ここでは、シリカメンブレンスピンカラムを使用したDNAの精製方法を紹介します。

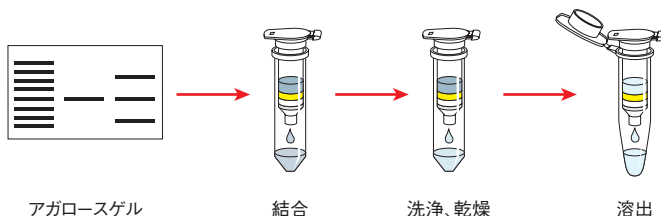
操作方法の概要

プラスミドの精製

NucleoSpin® Plasmid QuickPure使用の場合

①大腸菌培養液（高コピープラスミド：1～3 ml）を遠心し（11,000 × g、30秒）、上清を捨ててペレットを得る。
↓
②A1バッファー 250 μlを加え、Vortexで菌体を懸濁する。
↓
③A2バッファー 250 μlを加え、7～8回ほど転倒混和後、5分静置【溶菌】
↓
④A3バッファー 300 μlを加え、7～8回ほど転倒混和後、遠心する（11,000 × g、5分）。
↓
⑤上清をNucleoSpin®カラムに移して遠心（11,000 × g、1分）【結合】
↓
⑥AQバッファー（＋EtOH） 450 μlを加えて、遠心（11,000 × g、3分）【洗浄／乾燥】
↓
⑦AEバッファー 50 μlをカラムに加えて室温で1分置く。
↓
⑧遠心（11,000 × g、1分）によりプラスミド溶液を回収する。

アガロースゲルからDNAを精製

NucleoSpin® Extract II*使用の場合

①ゲル100 mgにNTバッファー200 μlを加え、50℃10分インキュベートしてゲルを溶解
↓
②NucleoSpin®カラムに溶液を移して遠心（11,000 × g、1分）【結合】
↓
③NT3バッファー（＋EtOH） 700 μlを加えて遠心（11,000 × g、1分）【洗浄】
↓
④カラムのメンブレンを乾燥（11,000 × g、2分）
↓
⑤NEバッファー（15～50 μl）をカラムに加えて室温で1分静置後、遠心（11,000 × g、1分）【溶出】

*NucleoSpin® Extract IIは、同じバッファーを用いてPCR産物のクリーンアップにも使用可能です。

! チェックポイント

陰イオン交換クロマトグラフィー（NucleoBond®シリーズ）

核酸は、低pH条件下でプラスにチャージしたイオン交換基に結合するが、高pH・高塩濃度条件にするとイオン交換基から解離する。これにより、核酸を高純度に精製することができる。
（→トランスフェクショングレードのプラスミドDNA精製など）

シリカメンブレンスピンカラム（NucleoSpin®シリーズ）

高濃度のカオトロピック塩を含むBinding Bufferと混合した核酸は、水和水が奪われた状態となりシリカメンブレンに結合するが、低塩濃度のElution Bufferを加えると核酸は再び水和水を獲得し、シリカメンブレンから解離して溶出される。シリカメンブレンの使用により、簡便かつ低コストでDNA精製を行うことができる。

【関連製品リスト】

下記リストの製品は、マッハライ・ナーゲル社の製品です。

	製品名	容量	製品コード	価格（税別）
プラスミドDNAミニプレップ	NucleoSpin® Plasmid	50回	740588.50	¥10,400
		250回	740588.250	¥48,400
	NucleoSpin® Plasmid QuickPure	50回	740615.50	¥10,500
		250回	740615.250	¥35,700
トランスフェクショングレードのプラスミドDNA精製	NucleoBond® Xtra Midi	10回	740410.10	¥13,700
		50回	740410.50	¥60,000
PCR産物のクリーンアップとゲル抽出の両方に使用可能	NucleoSpin® Extract II	50回	740609.50	¥12,300
		250回	740609.250	¥41,000
細胞・組織などからのtotal RNA精製	NucleoSpin® RNA II	50回	740955.50	¥31,800

アガロースゲル電気泳動

クローニング実験において、DNAの検出、定量は欠くことのできない操作です。その中でもアガロースゲル電気泳動によるDNA検出は日常的におこなわれる手法です。ここではアガロースゲル作製を中心に紹介します。

操作方法の概要

1.アガロースゲルの作製

（1%ゲル、150 ml作製の場合）

①アガロース粉末を1.5 g量り取る。
②適切な大きさの容器中*1で、室温または冷却したバッファー*2 150 mlを撹拌しながらアガロース粉末を加える。（容器全体の重量を量って記録しておく。）
③ラップで覆った後蒸気抜きの穴を開け、電子レンジにセットし加熱する。時々とめて攪拌し、完全に溶解する*3。
④加熱終了後電子レンジから出し、静かに攪拌して均一にし泡を取り除く。（必要に応じて再び重量を量り、温めた蒸留水を加えて蒸発した水分を補う。）
⑤溶液を室温に置いて50～60℃まで冷却し、コームをセットしたゲルトレイに流し入れる。ピペットチップなどで泡を取り除き、冷やし固める。
⑥適量のバッファーを重層後コームを外し、泳動槽に移す。（すぐに使用しない場合は、バッファーを満たした容器に入れ冷暗所保存する。）

*1 三角フラスコでもよいが、溶液の2～5倍容量のビーカーを使うことで突沸を防止できる。3%以上の高濃度ゲルを調製するときは、さらに大きな容器を使うことをお勧めする。
*2 3%以上の高濃度ゲルを調製する際アガロース粒子がバッファーに分散しにくい場合があるが、あらかじめバッファーを氷上で10分間ほど冷却しておくと分散しやすくなる。
*3 電子レンジで加熱する際は、容器全体が過熱し激しく沸騰することがあるので充分に注意が必要である。また、火傷を防ぐためにholderや断熱性手袋を使用することが望ましい。

2.電気泳動サンプルの準備

泳動サンプル溶液に1/10量の10 × Loading Bufferを加えてよく混合する。DNA分子量マーカーも同様に準備する。
ゲルのウェルにサンプル溶液をアプライする。

3.電気泳動

泳動装置（パワーサプライ）のスイッチを入れて電気泳動を開始する。電流の向きに注意する（泳動上流側に陰極、下流側に陽極をセットする）。適度に分離した時点でスイッチを切る。

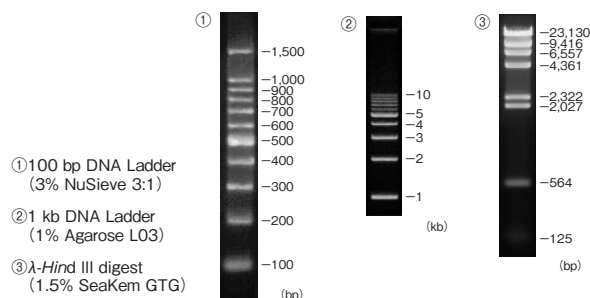
4.ゲルの染色

泳動後のゲルをエチジウムブロマイド（EtBr）、SYBR® Green Iなどの染色液に浸す。

〈アガロースの種類と濃度の選択〉

分離したい範囲	ゲル濃度	使用するアガロース
500 bp未満	3%	NuSieve™ 3:1 など
500～5,000 bp	1%	Agarose L03 など
5,000 bp以上	0.7%	

〈DNA分子量マーカーの泳動図〉

①100 bp DNA Ladder（3% NuSieve 3:1）
②1 kb DNA Ladder（1% Agarose L03）
③λ-*Hind* III digest（1.5% SeaKem GTG）

【関連製品リスト】

	製品名	容量	製品コード	価格（税別）
アガロース	Agarose L03「TAKARA」	100 g	5003	¥17,000
	NuSieve™ 3:1 Agarose*1	125 g	50090	¥62,700
泳動バッファー	AccuGENE™ 10 × TAE（Tris-Acetate-EDTA）Buffer*1	1 L	50844	¥8,500
電気泳動装置	Mupid®-2plus*2	一式	M-2P	¥40,762
分子量マーカー	100 bp DNA Ladder（Dye Plus）	500 μl（100回）	3422A	¥19,000
	1 kb DNA Ladder（Dye Plus）	500 μl（100回）	3426A	¥13,000
	λ-*Hind* III digest	100 μg	3403	¥8,500
ゲル撮影装置	Mupid®-Scope WD	一式	MS-WD	¥340,953

*1：Lonza社の製品です。　*2：アドバンス社の製品です。

タカラバイオ株式会社

東日本販売課　TEL 03-3271-8553　FAX 03-3271-7282
西日本販売課　TEL 077-543-7297　FAX 077-543-7293

TaKaRa テクニカルサポートライン
製品の技術的なご質問に専門の係がお応えします。
TEL 077-543-6116　FAX 077-543-1977

タカラバイオウェブサイト　http://www.takara-bio.co.jp
クロンテックウェブサイト　http://clontech.takara-bio.co.jp

取扱店

2011年7月作成30K